

## ORIGINAL ARTICLE

***Effect of interleukin-22 on immunogenicity of DNA vaccine encoding TSA gene of Leishmania major in BALB/c mice***

Hajar Ziaei-Hezarjaribi<sup>1</sup>,  
 Fatemeh Ghaffarifar<sup>2</sup>,  
 Abdolhossein Dalimi-Asl<sup>2</sup>,  
 Zohreh Sharifi<sup>3</sup>,  
 Oghol Niaz-Jorjani<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD, Assistant Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> PhD, Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> PhD, Professor, Department of Virology, Blood Transfusion Research Center, Tehran, Iran

<sup>4</sup> PhD, Assistant Professor, Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

(Received July 21, 2013; Accepted December 26, 2013)

**Abstract**

**Background and purpose:** Previous Research shows the use of plasmids containing genes TSA to be useful as vaccines for *Leishmania major*. Recently, the role of interleukin-22 (IL-22) in tissue repair has been demonstrated. In this research, the effect of IL-22 on encoding TSA gene of *Leishmania major* in BALB/c mice was assessed.

**Materials and methods:** pcDNA3 plasmid containing the gene encoding TSA protein (pcTSA) of *Leishmania major*, along with the cytokine IL-22 was used. 60 BALB/c mice were divided to 4 groups of 15. Control groups received pcDNA3 and PBS and a group was vaccinated intramuscularly with the TSA gene containing plasmid. Fourth group received plasmid containing the gene for the TSA and IL-22 protein. IL-4 and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) levels (MTT test) were used to evaluate the cellular immunity and IgG2a, IgG1 and Total IgG levels [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method] to evaluate the humoral immunity. Measuring the diameter of the lesions and the age and weight of the mice was performed.

**Results:** The simultaneous use of plasmid containing the gene encoding protein TSA and IL-22 significantly increased the mean level of IFN- $\gamma$  and reduced the mean level of IL-4 compared to the other groups. While the mortality rate at 27<sup>th</sup> week after intervention was 100 % in the control group, the surveillance rates of pcTSA and pcTSA + IL-22 groups were 80%. pcTSA + IL-22 group had the highest weight in 30<sup>th</sup> week. pcTSA + IL-22 group had significantly smaller lesions compared to control and pcTSA groups.

**Conclusion:** Results show the efficacy of pcTSA + IL-22 in improving the vaccination of cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** Interleukin-22, TSA gene, *Leishmania major*, BALB/c mice

J Mazand Univ Med Sci 2014; 23(110): 25-36 (Persian).

# بررسی اثر اینترلوکین-۲۲ در افزایش ایمنی‌زایی DNA واکسن کد کننده ژن TSA لیشمانیا ماژور در موش BALB/c

هاجر ضیایی هزار جریبی<sup>۱</sup>

فاطمه غفاری فر<sup>۲</sup>

عبدالحسین دلیمی اصل<sup>۲</sup>

زهره شریفی<sup>۳</sup>

اوغل نیاز جرجانی<sup>۴</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** تحقیقات قبلی، پلاسمید حاوی ژن TSA (Thiol-specific antioxidant) را به عنوان واکسن مفید در لیشمانیوز جلدی ناشی از لیشمانیا ماژور پیشنهاد داده بود. به تازگی نقش اینترلوکین-۲۲ (IL۲۲) در ترمیم بافت ثابت شده است. در این تحقیق اثر سیتوکین IL۲۲ به همراه پلاسمید کد کننده پروتئین TSA لیشمانیا ماژور در موش BALB/c بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** از پلاسمید نو ترکیب pcDNA۳ حاوی ژن کد کننده پروتئین TSA (pcTSA) لیشمانیا ماژور، همراه با سیتوکین IL۲۲ استفاده شد. ۶۰ سر موش ماده BALB/c به ۴ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. گروه‌های شاهد PBS و pcDNA۳ دریافت کردند و یک گروه از موش‌ها در سه نوبت با پلاسمید حاوی ژن TSA به صورت IM (Intramuscular) واکسینه شدند. گروه چهارم موش‌ها علاوه بر پلاسمید حاوی ژن TSA، پروتئین IL۲۲ را نیز دریافت نمودند. سنجش ایمنی سلولار با اندازه‌گیری سیتوکین‌های IL۴ و گاما اینترفرون و تست MTT و بررسی ایمنی هومورال با اندازه‌گیری IgG۱، IgG۲a و IgG total با روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) انجام گرفت. اندازه‌گیری قطر زخم، طول عمر و وزن موش‌ها نیز انجام شد.

**یافته‌ها:** استفاده توأم از پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین TSA همراه با IL۲۲ به صورت معنی‌داری باعث افزایش میانگین گاما اینترفرون و کاهش میانگین IL-۴ نسبت به سایر گروه‌ها شد؛ در حالی که میزان مرگ و میر در هفته ۲۷ بعد از چالش برای گروه‌های شاهد ۱۰۰ درصد و میزان بقا برای گروه‌های pcTSA + IL۲۲ و pcTSA به میزان ۸۰ درصد بود. گروه pcTSA + IL۲۲ بالاترین وزن را در هفته ۳۰ داشت. pcTSA + IL۲۲ با داشتن زخم کوچک‌تر نسبت به pcTSA و گروه‌های شاهد دارای اختلاف معنی‌داری با گروه‌های فوق بود.

**استنتاج:** نتایج به دست آمده کارایی pcTSA توأم با IL۲۲ را در بهبود اثر واکسیناسیون لیشمانیوز جلدی نشان می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** اینترلوکین-۲۲، ژن کد کننده پروتئین TSA، لیشمانیا ماژور، موش BALB/c

## مقدمه

وجود ندارد و گزارش‌های متعددی در خصوص عود، عدم

بهبودی و تأثیر نامناسب درمان وجود دارد (۱، ۲). تحقیقات اخیر

نشان داده است که ادجوانت‌ها (Adjuvant) و سیتوکین‌ها نقش

مهمی در توسعه ساخت واکسن‌های لیشمانیا دارند (۳-۷).

TSA (Thiol-specific antioxidant) آنتی-ژن

لیشمانیوزیس (Leishmaniasis) یکی از بیماری‌های تک

یاخته‌ای مشترک میان انسان و دام است که به اشکال جلدی،

جلدی مخاطی و احشایی دیده می‌شود. شکل روستایی این

بیماری در دنیا رو به افزایش می‌باشد و درمان قطعی هم برای آن

E-mail: ziaei2000@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** هاجر ضیایی هزار جریبی - ساری: میدان خزر، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص).

۱. استادیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استاد، گروه ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۶/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۰/۵

ایمونوزنیک قوی در هر دو مرحله پروماستیگوت و آماستیگوت انگل لیشمانیا می باشد. این پروتئین ۲۲/۱ کیلو دالتون است و طول آن ۶۰۰ جفت باز (Base pairs یا BP) و ۲۰۰ اسید آمینه دارد و در کروموزوم ۱۵ قرار گرفته است. ژن کد کننده پروتئین TSA هیچ اینترونی ندارد و کپی های زیادی از این ژن در همه گونه ها و انواع لیشمانیا جدا می شود و حداقل سه کپی از ژن در ژنوم لیشمانیا ماژور وجود دارد (۸، ۹). پروتئین TSA لیشمانیا در هر دو سیستم انسانی و موشی، آنتی ژنیک است. این آنتی ژن ایمنی ویژه و بالایی بر علیه تعداد زیادی اپی توپ های (Epitope) انگل تولید می کند. TSA یکی از کاندیداهای اصلی واکسن می باشد که تولید بالایی در لیشمانیا دارد و همچنین تیترا بالایی از IgG۲a و IGG۱ و پاسخ های مشخص از TH۱، گاما اینترفرون (IFN-γ) و IL-۲ CTL (CD۸+) را القا می کند (۶، ۱۰). این پروتئین هر دو کلاس پاسخ های ایمنی را القا کرده، در نتیجه پاسخ های ایمنی هومورال و سلولار را به خوبی بر علیه بیماری و در جهت کنترل آن تحریک می کند. پروتئین مذکور در مقایسه با پروتئین های دیگر حفاظت کامل تری ایجاد می کند و به عنوان یک پروتئین با اهمیت برای ایجاد توسعه مقاومت اکتسابی بر علیه لیشمانیازیس مطرح است (۱۱، ۱۲).

تحقیقاتی روی واکسن پروتئینی نو ترکیب TSA لیشمانیا ماژور همراه با اینترلوکین ۱۲ به عنوان ادجوانت انجام شده است (۱۳، ۱۴). نتایج این تحقیق نشان دهنده توسعه پاسخ های ایمنی سلولی قوی و محافظتی بر علیه لیشمانیوزیس بود. در تحقیق دیگری پروماستیگوت های با حرارت کشته شده لیشمانیا همراه با اینترلوکین ۱۲ و آلوم به عنوان واکسن به کار برده شد. گره های در محل واکسن فوق مشاهده شد. دوام این گره ها از زمانی که از دو پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین LmSTI۱ و TSA همراه با اینترلوکین ۱۲ استفاده شد، بیشتر بود. مطالعات بیشتر روی انگل های کشته شده با حرارت (به ویژه آنتی ژن ها) به طور کامل انجام شد که دوام و بقای گره به مقدار آنتی ژن به کار برده شده به عنوان واکسن بستگی دارد (۱۵، ۱۶). تحقیقاتی بر روی ژن های LACK، LmSTI۱ و TSA همراه با هم به عنوان DNA Vaccine انجام شد و نتایج آن

با واکسنی به صورت پروماستیگوت های کشته شده همراه با اینترلوکین ۱۲ که در سال ۱۹۹۹ توسط محققین کشف شد، مقایسه گردید. نتایج نشان داد که حفاظت ایجاد شده در DNA Vaccine طولانی تر بود (۱۷). با این حال TSA تاکنون ایمنی صددرد بر علیه لیشمانیا ایجاد نکرده است.

اینترلوکین ۲۲ (IL۲۲) یک سیتوکین عضو خانواده IL-۱۰ است که توسط سلول های Th۱، Th۱۷، Th۲۲، Dendritic cells و NK (Natural killer) تولید می شود و سایر اعضای این خانواده سیتوکینی شامل IL-۱۰، IL-۱۹، IL-۲۰، IL-۲۴ (MDA۱)، IL (TIF)، IL-۲۲ و IL-۲۶ می باشند (۱۸). گرچه اعضای این خانواده مشترکات ساختمانی بسیار زیادی دارند، اما از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمنولوژیک تفاوت های فاحشی بین آن ها وجود دارد.

IL۲۲ از محدود سیتوکین هایی است که وجودش حتی در غیر از پستانداران مانند ماهی ها به اثبات رسیده است (۲۰، ۱۹). IL۲۲ باعث فعال سازی JAK۱، TYK۲، STAT۱، STAT۳، STAT۵ و مسیر MAP (Mitogen-activated protein) می شود (۲۱، ۱۹، ۱۸). امروزه ثابت شده است که سلول های کراتینوسیت پوستی واجد گیرنده برای این سیتوکین هستند (۲۲، ۲۳). IL۲۲ در پوست سبب القای پپتیدهای ضد میکروبی شده، تکثیر کراتینوسیت ها را افزایش و تمایز آن ها را مهار می کند و نقشی در التیام پوست در مکانیسم دفاعی ذاتی دارد (۲۳). IL۲۲ تولید شده به وسیله سلول های NK با فعال کردن ماکروفاژها و افزایش فعالیت فاگولیزوزوم، رشد مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را مهار می کند (۲۴).

مطالعه ای در یک منطقه بومی نشان داد که میزان سیتوکین IL۲۲ افراد مقاوم به کال آزار انسانی نسبت به افراد حساس بالاتر است. از طرفی انگل لیشمانیا دونووانی (Leishmania donovani) تمایز سلول های Th-۱۷ را برای تولید IL۲۲ و گاما اینترفرون تحریک می کند (۲۲). با توجه به این که گزارش های متعددی در خصوص عود، عدم بهبودی و تأثیر نامناسب درمان لیشمانیوز وجود دارد و به تازگی نیز نقش IL۲۲ به عنوان یک سیتوکین در پاسخ های التهابی و ایجاد

حفاظت در ایمنی ذاتی و کنترل عفونت‌های مختلف و هموستازی و بهبود سلول‌های اپی تلیال صدمه دیده ثابت شده است؛ بنابراین هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر سیتو کین IL۲۲ همراه با پلاسمید کد کننده پروتئین TSA لیشمانیا ماژور در درمان لیشمانیوز جلدی در موش‌های Balb/c بود.

## مواد و روش‌ها

### پلاسمید

پلاسمید نو ترکیب بیانی pcDNA۳ حاوی ژن TSA با طول ۶۰۰ جفت باز که پروتئین نو ترکیب TSA با وزن مولکولی در حدود ۲۲/۱ کیلودالتون تولید می‌کند، در بخش انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس ساخته و بیان آن توسط طباطبایی و همکاران (۲۵) و فاطمه و همکاران (۲۶) ارزیابی شد، در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. کشت اولیه و انبوه پلاسمید حاوی ژن TSA و پلاسمید pcDNA۳ با کتری TG۱ با استفاده از محیط کشت L.B Broth شرکت Merck انجام شد. در مرحله بعد استخراج پلاسمید با استفاده از کیت EndoFree Plasmid Mega Kit شرکت کیاژن انجام گرفت. سپس غلظت پلاسمیدهای استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد و رقت‌سازی بر اساس میزان تزریق ۵۰ میکروگرم به ۱۵ سر موش انجام گرفت.

### آماده‌سازی موش‌ها

۶۰ سر موش سفید ماده خالص Balb/c inbred به دلیل حساس بودن به پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در سن ۸ هفته‌گی از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی حصارک کرج به عنوان مدل حیوان آزمایشگاهی در این تحقیق انتخاب و خریداری و تحت شرایط استاندارد از لحاظ آب و غذا نگهداری شدند. گروه‌بندی موش‌ها بر اساس نوع ماده تزریقی انجام گرفت. ۶۰ موش ماده Balb/c به ۴ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند که شامل گروه‌های دریافت کننده pcDNA۳ و PBS (Phosphate buffered saline) به عنوان گروه‌های شاهد و یک گروه با ۱۵ موش دریافت کننده pcTSA و یک گروه هم

شامل ۱۵ موش دریافت کننده pcTSA + IL۲۲ بودند. در هر یک از گروه‌ها نیز موش‌ها به سه دسته ۵ تایی تقسیم شدند. یک دسته ۵ تایی فقط واکسینه می‌شدند، بدون این که به انگل آلوده شوند و دسته دوم و سوم بعد از واکسینه شدن با انگل چالش می‌شدند. سنجش ایمنی سلولار و هومورال در گروه‌های شاهد و ایمن شده در دسته‌های اول و دوم صورت گرفت و بررسی‌های بالینی در موش‌های دسته سوم انجام شد.

### ایمنی‌زایی (واکسیناسیون)

در این مطالعه جهت واکسیناسیون یک گروه ۱۵ تایی از موش‌ها، بافر PBS را (۱۰۰ میکرولیتر) و گروه دیگر پلاسمید pcDNA۳ را به عنوان گروه شاهد (با غلظت ۵۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر) و ۳۰ موش دیگر پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین TSA را به میزان ۵۰ میکروگرم در حجم ۱۰۰ میکرولیتر (رقیق شده با PBS) و در سه نوبت به فاصله سه هفته دریافت نمودند. به یک گروه ۱۵ تایی از موش‌های دریافت کننده پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین TSA، سیتو کین IL۲۲ که از شرکت R&D با Cat.number 582-ML بر اساس دستور پروتکل شرکت سازنده در PBS استریل حاوی ۱ درصد از BSA آماده شده بود، قبل از چالش موش‌ها با انگل لیشمانیا به میزان ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر به صورت تک دوز در عضله چهار سران (Quadriceps) در حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سرنگ انسولین با سر سوزن اندازه ۳۰ (Gauge۳۰) تزریق گردید (۲۷).

### چالش

۳ هفته بعد از آخرین ایمنی‌زایی، آلوده‌سازی موش‌های Balb/c با انگل لیشمانیا ماژور صورت گرفت و موش‌ها با تعداد حداقل  $2 \times 10^6$  پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور (L.major) سویه استاندارد ایرانی MRHO/IR/75/ER در فاز ایستا (Stationary) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از طریق تلقیح زیرجلدی در قاعده دم چالش شدند که بعد از ۴-۳ هفته بعد از تزریق در لمس ناحیه تزریق برجستگی و گره احساس شد و سپس زخم حاصل از رشد انگل در قاعده دم موش تشکیل گردید.

#### بررسی ایمنی هومورال

برای بررسی ایمنی هومورال، خون گیری از موش ها در سه نوبت انجام شد. خون گیری اول سه هفته پس از واکسیناسیون دوم و خون گیری دوم سه هفته پس از واکسیناسیون سوم و خون گیری سوم ۷ هفته پس از چالش با انگل، به کمک لوله های موینه غیر هپارینه از گوشه چشم موش ها انجام شد. سرم خون موش ها برای بررسی ایمنی هومورال، جمع آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. بررسی ایمنی هومورال بر روی سرم موش های ایمن شده و گروه های شاهد با اندازه گیری مقدار مجموع IgG با استفاده از آزمایش ELISA انجام شد. علاوه بر این، زیرگروه های آنتی بادی شامل IgG۱ و IgG۲a نیز با استفاده از کیت Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents شرکت Sigma مورد سنجش قرار گرفت.

#### بررسی ایمنی سلولی

برای بررسی ایمنی سلولی از دو روش سنجش سیتوکین و روش MTT استفاده شد.

در روش اول برای وجود سیتوکین های IFN- $\gamma$  و Cytokine assay (IL-۴) از سوپ سلولی لنفوسیت های طحالی موش ایمن شده و شاهد (چالش نشده و چالش شده) استفاده شد. ۷ هفته پس از تزریق یادآور سوم (قبل از چالش با انگل) و ۷ هفته پس از چالش با انگل، استخراج لنفوسیت از طحال در شرایط استریل صورت گرفت. طحال موش های کشته شده در محلول PBS استریل سرد له و به سوسپانسیون سلولی تبدیل شد.

با توجه به تعداد سلول های جدا شده از هر طحال، به دلیل این که تعداد سلول های لنفوسیت در هر چاهک کشت پلیت ۲۴ خانه ای، باید  $2 \times 10^6$  باشد، مقداری از سلول برای کشت در چاهک (با انجام محاسبات) برداشته شد. سپس به هر چاهک مقدار ۵۰ میکروگرم آنتی ژن اضافه گردید (لنفوسیت ها توسط آنتی ژن انگل تحریک می شوند). بعد از آن حجم سوسپانسیون هر چاهک توسط محیط RPMI-۱۶۴۰ که حاوی FCS (Fetal calf serum) ۱۰ درصد بود، به

۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پلیت ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد دارای دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند. پس از این مدت، محتویات رویی سلول ها به آرامی در ۷۲ ساعت جمع آوری و در ویال اپندورف جمع شد و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی در مقادیر ۳۰۰ میکرولیتر در ویال ها تقسیم گردید و تا زمان سنجش سیتوکین در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۲۸).

جهت بررسی وجود سیتوکین های گاما اینترفرون و اینترلوکین ۴ با روش ELISA و با استفاده از کیت U-cytech-biosciences کشور هلند، از سوپ سلولی لنفوسیت های طحال موش های ایمن و شاهد که در ۷۰- نگهداری شده بود، استفاده گردید و با استفاده از استاندارد موجود در کیت، منحنی استاندارد رسم شد و نمونه های مورد آزمایش بر این اساس ارزیابی شدند.

#### آزمون MTT

از روش MTT [2,5-(4,5-dimethyl thiazoyl)-3-bromide] برای بررسی پرولیفراسیون لنفوسیت ها به صورت زیر استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون لنفوسیتی استخراج شده به هر چاهک در میکروپلیت های ۹۶ خانه ای مخصوص کشت سلول اضافه شد (یعنی  $3 \times 10^5$  سلول به ازای هر چاهک). سوسپانسیون سلولی حاصل از طحال هر موش در ۳ چاهک کشت داده شد. به دو چاهک از هر گروه، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی ژن انگل لیثمانیا مازور افزوده شد. به یک چاهک دیگر همان گروه هیچ آنتی ژنی اضافه نگردید. حجم نهایی هر چاهک با استفاده از RPMI + FBS (Fetal bovine serum) (۱۰ درصد) به ۲۰۰ میکرولیتر رسید.

پلیت های کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد دارای دی اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفت. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر لنفوسیت، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT

مقایسه گروه‌های وابسته غیر پارامتریک با یکدیگر از آزمون‌های تعقیبی Wilcoxon استفاده شد.

## یافته‌ها

### نتایج بررسی ایمنی سلولی

#### سنجش سیتوکین‌ها

۱- گاما اینترفرون ( $\gamma$ -IFN): با انجام آزمون Mann-Whitney U میانگین میزان گاما اینترفرون، ۷۲ ساعت قبل و بعد از چالش همه گروه‌های ایمن نسبت به گروه‌های شاهد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود.  $pcTSA + IL22$  با داشتن میانگین بالاتر در میزان گاما اینترفرون (۷۲ ساعت بعد از چالش) نسبت به  $pcTSA$  اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱).

۲- اینترلوکین ۴: با انجام آزمون Mann-Whitney U مقایسه میانگین  $IL-4$  گروه‌های شاهد PBS با  $pcDNA3$ ، اختلاف معنی‌داری قبل و بعد از چالش مشاهده نشد. همچنین گروه‌های ایمن  $pcTSA + IL22$  با  $pcTSA$  اختلاف معنی‌داری در میانگین  $IL-4$  قبل و بعد از چالش نداشتند ( $P < 0.05$ )، اما در مورد کاهش میانگین  $IL-4$  گروه  $pcTSA + IL22$  و  $pcTSA$  اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد PBS و  $pcDNA3$  ۷۲ ساعت بعد از چالش مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱).

#### میزان بقا

میزان بقا در همه گروه‌های ایمن و شاهد با یا بدون دریافت  $IL22$  تا هفته ۶ بعد از چالش ۱۰۰ درصد بود. مرگ و میر گروه‌های شاهد از هفته هفتم بعد از چالش اتفاق افتاد (۲۰ درصد مرگ و میر و ۸۰ درصد بقا) که نرخ فوق برای گروه‌های  $TSA + IL22$  و  $TSA$  در هفته بیست و سوم روی داد. با وجود این که نرخ مرگ و میر ۱۰۰ درصد برای گروه‌های شاهد  $pcDNA3$  و PBS در هفته ۲۶ و ۲۷ بود، اما در این مقطع برای گروه  $pcTSA + IL22$  و  $pcTSA$  بقای ۸۰ درصد اتفاق افتاد (نمودار شماره ۱).

(غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه گردید. پلیت مذکور دوباره به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد دارای دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شد (تا بلورهای فورمازان نمایان شوند). سوپ سلولی به آرامی بدون هم زدن محتویات چاهک‌ها سانتریفوژ شد و محتویات رویی به طور کامل خارج شد. به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه Elisa Reader خوانده شد. نتایج آزمایش به صورت شاخص تحریک (Stimulation index یا SI) محاسبه گردید (۲۹).

#### اندازه‌گیری قطر زخم و وزن موش‌ها

پس از انجام چالش با انگل و ظاهر شدن زخم در قاعده دم موش، اندازه‌گیری قطر زخم با استفاده از کولیس دیجیتال به طور هفتگی صورت گرفت؛ به طوری که حاصل جمع طول و عرض قطر زخم بر عدد ۲ تقسیم و به عنوان عدد مربوط به قطر زخم در نظر گرفته می‌شد. وزن موش‌ها طی درمان به صورت هفتگی با ترازو اندازه‌گیری و یادداشت گردید.

#### بررسی طول عمر موش‌ها

پس از چالش با انگل موش‌های گروه‌های واکسینه شده و شاهد، طول عمر و بقای آن‌ها نیز به طور هفتگی پیگیری شد.

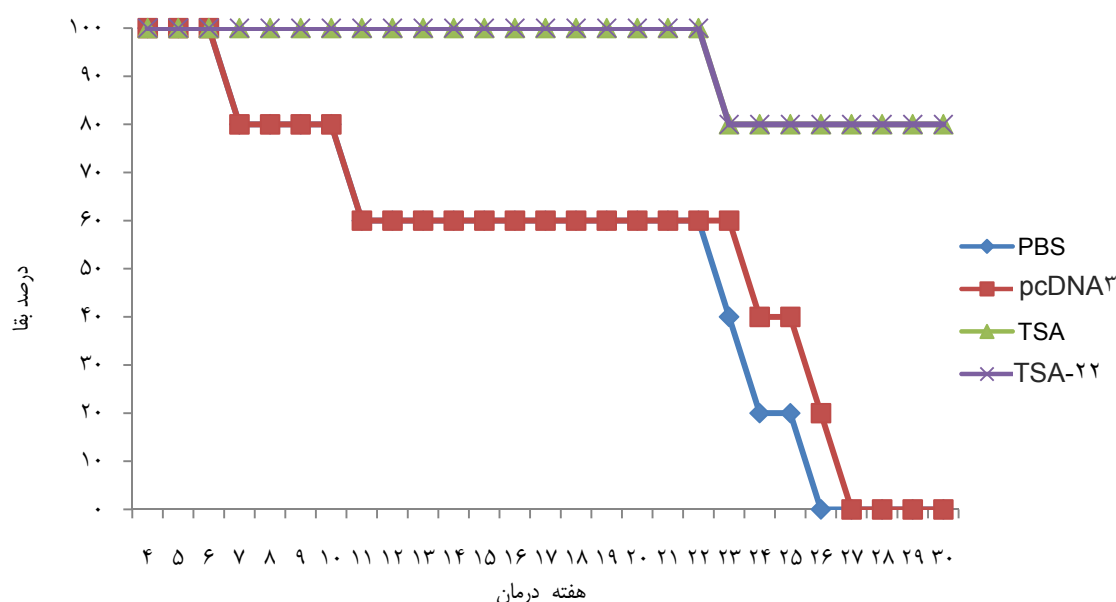
#### تحلیل آماری

اطلاعات به دست آمده از اندازه‌گیری گاما اینترفرون،  $IL4$ ،  $IgG$ ،  $IgG2a$  و  $IgG$  Total و MTT و بررسی قطر زخم و بقای موش‌ها در گروه‌های شاهد و مورد به نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) وارد شد و جهت توصیف داده‌ها و محاسبه شاخص‌های مرکزی و پراکندگی آن‌ها (میانگین و انحراف معیار) محاسبه گردید. در راستای مقایسه گروه‌های مستقل غیر پارامتریک از آزمون Mann-Whitney U جهت بررسی آزمون‌های تعقیبی آشکارسازی اختلاف بین گروه‌های مستقل غیر پارامتریک از آزمون Kruskal-Wallis و برای مقایسه اثر گذشت زمان از آزمون Friedman و جهت

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین غلظت IL-۴ و گاما/اینترفرون ۷۲ ساعت قبل و بعد از چالش در موش‌های شاهد و ایمن با یا بدون دریافت سیتوکین

گروه	گاما/اینترفرون (۷۲ ساعت قبل از چالش)	گاما/اینترفرون (۷۲ ساعت بعد از چالش)	IL-۴ (۷۲ ساعت قبل از چالش)	IL-۴ (۷۲ ساعت بعد از چالش)
PBS	۲۷۴/۰۰۰	۱۷۶/۲۵۰	۱۵۳/۷۵۰	۲۰۳/۷۵۰
	انحراف معیار	۳۴/۴۹۰	۳۳/۲۶۰	۱۴/۳۳۸
pcDNA۳	۱۲۸/۲۵۰	۱۲۳/۷۵۰	۱۸۶/۲۵۰	۲۲۹/۷۵۰
	انحراف معیار	۲۰/۱۳۹	۳۲/۵۰۰	۳۳/۶۶۹
pcTSA	۶۷۶/۲۵۰	۵۶۲/۵۰۰	۱۵۲/۲۵۰	۵۵/۵۰۰
	انحراف معیار	۸۱/۴۹۶	۲۴/۵۰۰	۱۹/۱۵۷
pcTSA + IL۲۲	۷۰۳/۰۰۰	۹۱۲/۰۰۰	۱۳۴/۲۵۰	۳۷/۵۰۰
	انحراف معیار	۵۲/۹۳۴	۱۲/۰۶۶	۱۲/۵۰۳

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin



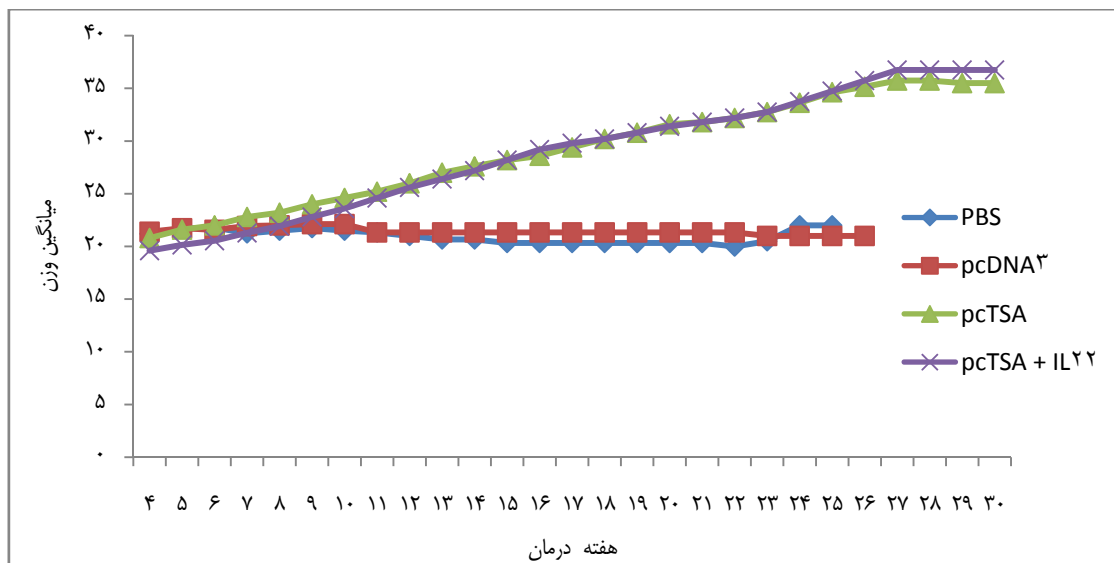
نمودار شماره ۱: درصد مرگ و میر و بقا در موش‌های دریافت کننده TSA + IL۲۲ و TSA و مقایسه با گروه‌های شاهد طی بررسی در ۳۰ هفته  
PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant

#### وضعیت زخم

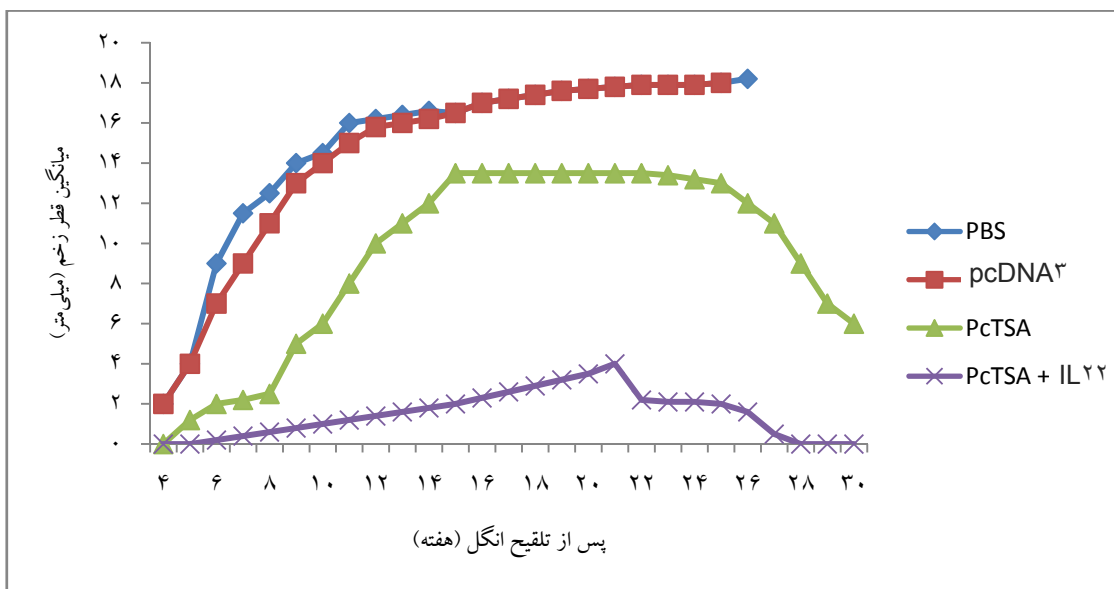
در هفته ۳۰، گروه pcTSA + IL۲۲ وزن بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها داشت. میانگین وزن موش‌های گروه‌های مختلف دریافت کننده pcTSA + IL۲۲ و pcTSA در طی ۲۷ هفته بعد از بروز زخم و یا ۳۰ هفته بعد از چالش افزایش منظمی را نسبت به گروه‌های شاهد نشان دادند. با انجام آزمون Mann-Whitney U، میانگین وزنی گروه pcTSA + IL۲۲ و pcTSA از افزایش بالاتری نسبت به pcDNA۳ و PBS برخوردار بود و این اختلاف با گروه‌های شاهد فوق معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0/05$ ) (نمودار شماره ۲).

#### وزن

با pcTSA + IL۲۲ با داشتن زخم کوچک‌تر نسبت به pcTSA و گروه‌های شاهد با انجام آزمون تعقیبی Mann-Whitney U در تمام هفته‌ها اختلاف معنی‌داری با گروه‌های فوق داشت ( $P < 0/05$ ). بروز زخم با میانگین ۰/۶۶ میلی‌متر در گروه گیرنده pcTSA + IL۲۲ در روز ۴۴ بعد از چالش اتفاق افتاد؛ در صورتی که اندازه زخم در روز ۳۰ پس از چالش در گروه pcDNA۳ برابر با ۲/۵۶، در گروه PBS برابر با ۲/۸۲ و در گروه pcTSA به میزان ۱/۳۰ میلی‌متر بود (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۲: میانگین وزن در موش‌های دریافت‌کننده pcTSA و pcTSA + IL22 و مقایسه با گروه‌های شاهد طی بررسی در ۳۰ هفته  
PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-22



نمودار شماره ۳: میانگین اندازه زخم در موش‌های دریافت‌کننده pcTSA و pcTSA + IL22 و مقایسه با گروه‌های شاهد طی بررسی در ۳۰ هفته

#### آزمون MTT

از واکسیناسیون دوم و سوم و قبل از چالش با انجام آزمون تعقیبی Mann-Whitney U نشان داده شده است (نمودارهای شماره ۵-۷) (جدول شماره ۳).

گروه pcTSA + IL22 و pcTSA در مرحله دوم و سوم با گروه‌های شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). همچنین، گروه TSA-22 در مرحله اول نیز با همه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۳).

میانگین آزمون MTT بعد از چالش در همه گروه‌ها با وجود معنی‌دار نشدن بیشتر از قبل چالش بود (جدول شماره ۲) (نمودار شماره ۴).

#### نتایج بررسی ایمنی هومورال

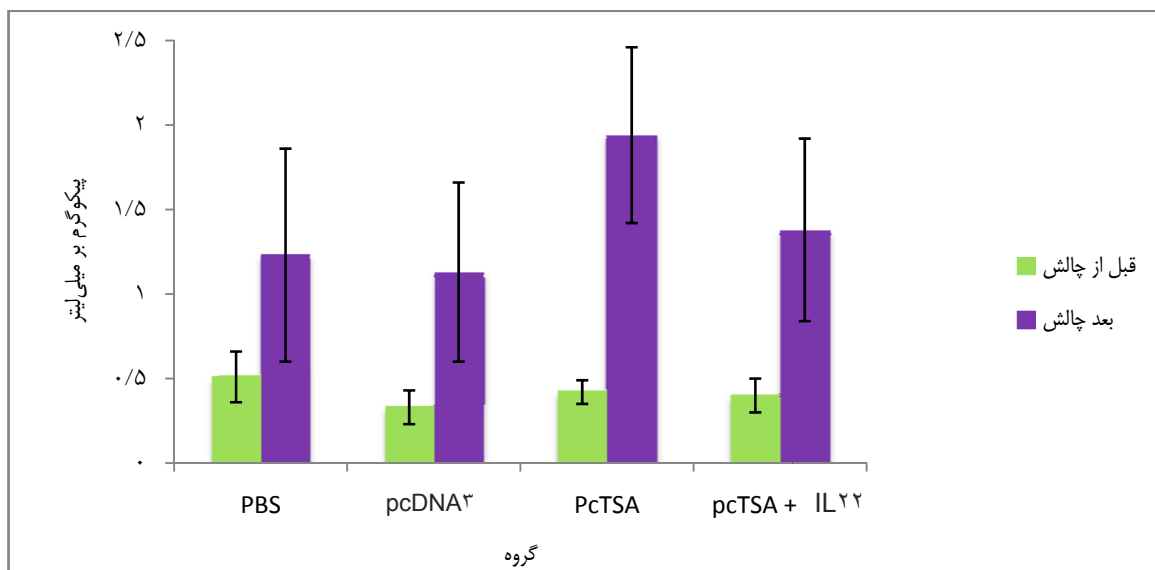
بررسی میانگین و انحراف معیار IgG total، IgG1 و IgG2a در گروه‌های مختلف ایمن و شاهد در سه مرحله بعد



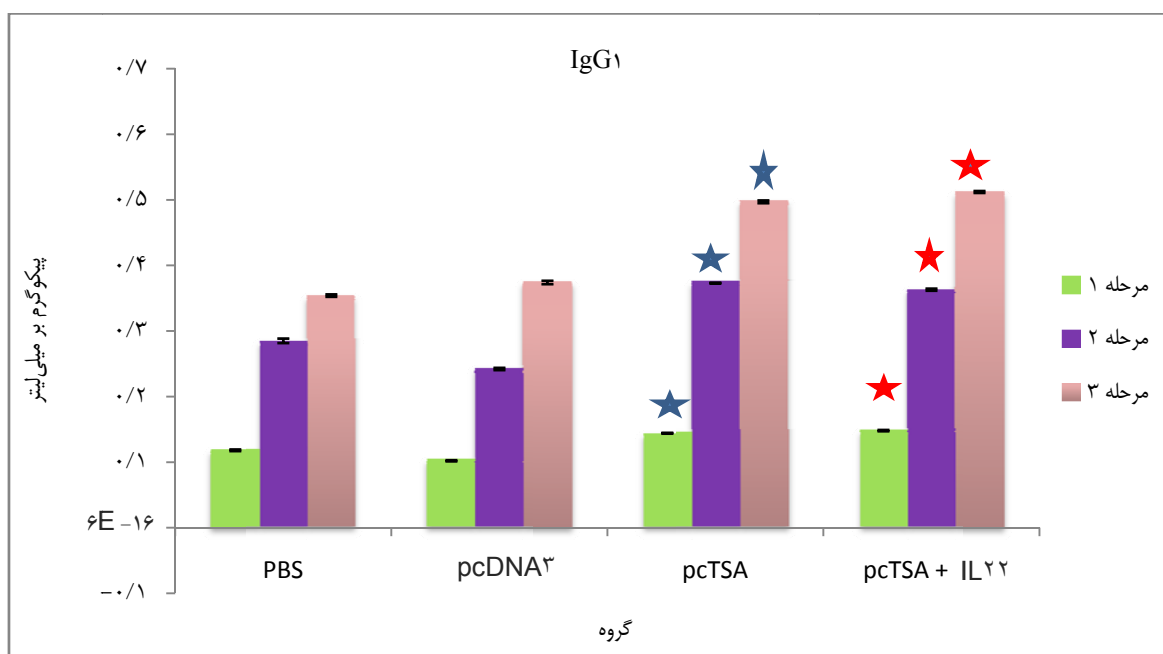
جدول شماره ۲: مقایسه میانگین و انحراف معیار MTT قبل و بعد از چالش گروه‌های شاهد و ایمن با یا بدون دریافت سیتوکین

گروه تحت مطالعه	OD MTT		سطح معنی‌داری
	مرحله ۱	مرحله ۲	
PBS	$0.148 \pm 0.0508$	$0.632 \pm 0.226$	۰/۰۴۶
pcDNA۳	$0.099 \pm 0.0326$	$0.530 \pm 0.131$	۰/۰۲۸
TSA	$0.073 \pm 0.0423$	$0.517 \pm 0.0944$	۰/۰۲۸
TSA-۲۲	$0.104 \pm 0.0396$	$0.536 \pm 0.377$	۰/۰۲۸

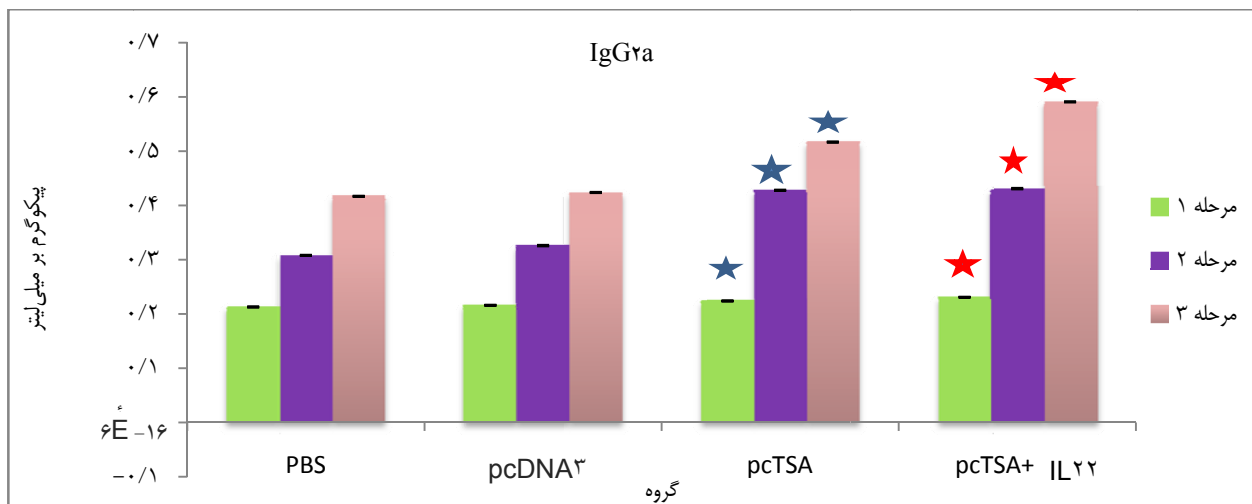
OD: Absorbance; MTT: (4,5- dimethyl thiazoyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium(3- bromide); PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant



نمودار شماره ۴: میانگین میزان MTT در موش‌های دریافت‌کننده pTSA و pTSA + IL-۲۲ و مقایسه با گروه‌های شاهد قبل و بعد از چالش  
MTT: (4,5- dimethyl thiazoyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium(3- bromide); PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin

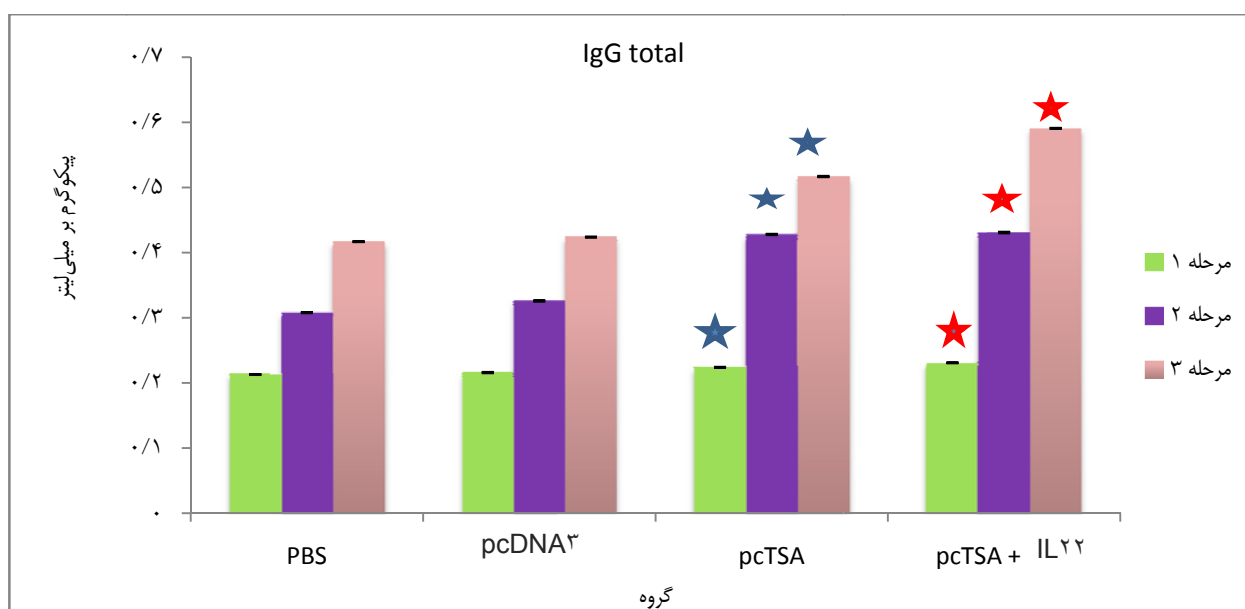


نمودار شماره ۵: میانگین میزان در موش‌های دریافت‌کننده pTSA و pTSA + IL۲۲ و مقایسه با گروه‌های شاهد قبل و بعد از چالش  
PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-۲۲



نمودار شماره ۶: میانگین میزان IgG2a در موش‌های دریافت کننده pcTSA و pcTSA+ IL<sup>22</sup> و مقایسه با گروه‌های شاهد قبل و بعد از چالش

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-<sup>22</sup>



نمودار شماره ۷: میانگین میزان IgG Total در موش‌های دریافت کننده pcTSA و pcTSA+ IL<sup>22</sup> و مقایسه با گروه‌های شاهد قبل و بعد از چالش

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-<sup>22</sup>

جدول شماره ۳: مقایسه میانگین و انحراف معیار IgG2a و IgG1 و IgG total در گروه‌های شاهد و دریافت کننده سیتوکین در سه مرحله

گروه تحت مطالعه	IgG1 (میانگین ± انحراف معیار)			IgG2a (میانگین ± انحراف معیار)			IgG Total (میانگین ± انحراف معیار)		
	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
PBS	0.118 ± 0.013	0.285 ± 0.034	0.354 ± 0.019	0.393 ± 0.010	0.414 ± 0.008	0.422 ± 0.008	0.231 ± 0.003	0.308 ± 0.005	0.417 ± 0.004
pcDNA <sup>3</sup>	0.102 ± 0.001	0.242 ± 0.017	0.374 ± 0.026	0.395 ± 0.001	0.412 ± 0.008	0.441 ± 0.005	0.216 ± 0.005	0.326 ± 0.008	0.424 ± 0.005
pcTSA	0.144 ± 0.006	0.373 ± 0.006	0.497 ± 0.021	0.427 ± 0.009	0.591 ± 0.001	0.727 ± 0.003	0.224 ± 0.005	0.428 ± 0.006	0.517 ± 0.005
pcTSA + IL <sup>22</sup>	0.148 ± 0.010	0.363 ± 0.017	0.512 ± 0.001	0.437 ± 0.024	0.581 ± 0.006	0.792 ± 0.006	0.231 ± 0.004	0.431 ± 0.008	0.591 ± 0.001

PBS: Phosphate buffered saline; TSA: Thiol-specific antioxidant; IL: Interleukin-<sup>22</sup>

مرحله ۳: قبل از چالش

مرحله ۲: بعد از واکسیناسیون سوم

مرحله ۱: بعد از واکسیناسیون دوم

## بحث

در مورد لیشمانیا ماژور، انتخاب آنتی ژنی که به وسیله واکسن DNA کد گردد و از طریق ژنتیکی به مولکول های MHC (Major histocompatibility complex) سطح سلول متصل شود، سیستم ایمنی را تحریک نماید و استفاده از استراتژی مناسب برای واکسیناسیون که باعث افزایش ایمنوژنیسته سلول T و ایجاد پاسخ ایمنی سلولی محافظت کننده بر علیه پاتوژن داخل سلولی شود، از اهمیت زیادی برخوردار است (۸، ۷، ۲).

در این تحقیق از پلاسمید کد کننده پروتئین TSA لیشمانیا ماژور استفاده شد (۲۶، ۲۵). امروزه استفاده از ادجوانت ها و سیتوکین های مختلف برای بهبود و اصلاح پاسخ ایمنی القا شده به وسیله DNA واکسن های لیشمانیا به خصوص استفاده از سیتوکین های IL۱۲ در فرمولاسیون DNA واکسن ها به منظور افزایش پاسخ های پروتکتیو زیرمجموعه سلول T، انجام می شود (۷). نتایج این پژوهش در صد بقای بالا و کاهش مرگ و میر، افزایش چشمگیر وزن، کاهش قطر زخم و نتایج بررسی های ایمنی سلولار و هومورال را نشان می دهد که در موش های دریافت کننده توأم IL۲۲ با ژن TSA به طور مشخص، افزایش تولید گاما اینترفرون و کاهش تولید IL۴ ایجاد می شود و باعث ایجاد پاسخ های ایمنی Th۱ می گردد. در نتیجه سبب افزایش کارایی این سیستم در بهبود لیشمانیوز جلدی می شود.

در این مطالعه از سیتوکین IL۲۲ برای اولین بار در دوز ۵ نانوگرم استفاده شد؛ چرا که در ارزیابی دو دوز مختلف ۵ و ۱۰ نانوگرم سیتوکین IL۲۲ محققین پیش تر به این نتیجه رسیده بودند که دوز ۵ نانوگرم این سیتوکین کارایی بهتری نسبت به ۱۰ نانوگرم دارد و بر اساس بعضی تحقیقات از بعضی دوز های مورد استفاده IL۲۲ عوارض جانبی گزارش شد (۳۱، ۳۰). به منظور افزایش تولید این سیتوکین و گران بودن پروتئین نو ترکیب IL۲۲، در آینده می توان از ژن های کد کننده سیتوکین IL۲۲ به ژن آنتی ژن اضافه کرد تا قدرت ایمنی زایی واکسن افزایش یابد.

یکی از ملاک های بررسی روند بالینی موش های ایمن و شاهد در این تحقیق وضعیت زخم بود.

اندازه زخم گروه های دریافت کننده pcDNA۳، pcTSA و

PBS روند صعودی داشت. کاهش میانگین اندازه زخم و مدت زمانی که اندازه زخم به حداکثر رسید در گروه دریافت کننده IL۲۲ + pcTSA نسبت به گروه های شاهد و ایمن دارای اختلاف معنی داری بود که احتمال دارد IL۲۲ توأم با pcTSA به صورت موضعی در پوست در لیشمانیوز جلدی برای کاهش رشد و بهبودی زخم بهتر از pcTSA عمل نموده باشد (۳۲، ۲۳).

از آنجایی که عامل زمان تأثیر قاطعی بر روند بیماری، وزن موش ها و اندازه قطر زخم دارد، بدیهی است که با گذشت زمان عفونت در حیوان تثبیت شده و بیماری بروز می کند. این مسأله منجر به بروز علائم در حیوان، کم خوراکی و از سویی تحلیل رفتن آن و در مجموع کاهش وزن حیوان می شود و در موش های گروه شاهد PBS یا pcDNA۳، روند پیشرفت زخم و کاهش وزن نسبت به سایر گروه ها معنی دار بود. میانگین وزن موش های گروه های دریافت کننده pcTSA و IL۲۲ + pcTSA افزایش منظمی را در طول بررسی نسبت به گروه های شاهد PBS و pcDNA۳ نشان داد که این اختلاف با  $P < 0.05$  معنی دار شده بود. همچنین در مقایسه وزن گروه های ایمن pcTSA + IL۲۲ و pcTSA مشاهده شد که pcTSA بیشتر منجر به کاهش وزن واحدهای نمونه ای می شود یا به عبارتی IL۲۲ + pcTSA در بهبود وزن موش ها نسبت به pcTSA مؤثر تر عمل نمود؛ بنابراین می توان گفت که سیتوکین IL۲۲ در بهبود وزن موش های واکسینه در گروه دریافت کننده آن بهتر عمل نموده است.

از آنجایی که ارزیابی عمده در محیط طبیعی (داخلی)، تعیین الگوی Th۲ و Th۱ است؛ به همین دلیل IL-۴ و گاما اینترفرون سنجیده شد (۱۱). IL۲۲ + pcTSA در افزایش تولید گاما اینترفرون ۷۲ ساعت بعد از چالش نسبت به pcTSA اختلاف معنی داری داشت ( $P < 0.05$ ) و نمایانگر آن است که موش های دریافت کننده IL۲۲ سبب ایجاد پاسخ های سیتوکین Th۱ می شوند. تحقیقات قبلی نیز نشان داده است که IL۲۲ یک اثر حفاظتی در برابر بیماری کالآزار انسانی دارد و لیشمانیا دونووانی تمایز سلول های Th-۱۷ را برای تولید IL-۱۷، IL۲۲ و گاما اینترفرون تحریک می کند (۲۲).

سلولی و تقویت کننده قوی ایمنی هومورال است؛ اما با وجود داشتن مشترکات ساختمانی بسیار زیاد این دو از لحاظ عملکرد بیولوژیک و ایمنولوژیک تفاوت‌های فاحشی دارند (۱۸، ۱۹).

بررسی میانگین  $IgG_1$ ،  $IgG_2a$  و  $IgG$  total در گروه‌های مختلف ایمن و شاهد در سه مرحله بعد از واکسیناسیون دوم و سوم و قبل از چالش نشان داد که گروه دریافت کننده  $IL_{22} + pcTSA$  نسبت به گروه شاهد در مرحله دوم و سوم بهتر از گروه  $pcTSA$  عمل نموده است که شاید علت تفاوت موجود این باشد که مرحله سوم جمع آوری سرم موش‌ها برای اندازه‌گیری  $IgG$  total،  $IgG_2a$  و  $IgG_1$  بعد از تزریق سیتوکین  $IL_{22}$  صورت گرفت؛ در صورتی که جمع آوری سرم موش‌ها برای اندازه‌گیری مرحله اول و دوم  $IgG$  total،  $IgG_2a$  و  $IgG_1$  قبل از تزریق سیتوکین  $IL_{22}$  بود که این امر کارایی و نقش سیتوکین  $IL_{22}$  را در تحریک سیستم ایمنی هومورال گروه‌های با یا بدون ژن نشان می‌دهد. میانگین MTT بعد از چالش کلیه گروه‌ها بیشتر از قبل چالش است.

به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده تأثیر بالای سیتوکین  $IL_{22}$  همراه با ژن کد کننده پروتئین TSA در تحریک هر دو سیستم ایمنی سلولی و هومورال در مدل موشی و بهبود زخم‌های لیشمانیایی ناشی از لیشمانیا ماژور بود.

هزار جریبی و همکاران در تحقیق دیگری دریافتند که اثر سیتوکین  $IL_{22}$  روی پلاسمید کد کننده ژن LACK با افزایش گاما اینترفرون و کاهش اینترلوکین ۴ همراه می‌باشد و سبب ایجاد پاسخ‌های سیتوکین  $Th_1$  می‌شود (۳۳).

از طرف دیگر، عفونت لیشمانیایی بستگی به فعال شدن یکی از دو زیرگروه‌های سلولی  $CD4^+$  (یعنی  $Th_1$  و  $Th_2$ ) دارد و پاسخ  $Th_1$  با ترشح سیتوکین‌هایی مانند  $IFN-\gamma$  و  $IL-TNF-B$  واسطه بهبودی می‌باشند و گاما اینترفرون حاصل از این سلول‌ها به عنوان قوی‌ترین سیتوکین فعال کننده ماکروفاژها است و فعال شدن ماکروفاژها منجر به تولید نیتریک اکسید (NO) و سرانجام منجر به مرگ انگل می‌شود (۳۴، ۳۵).

میانگین اینترلوکین ۴ گروه‌های ایمن نسبت به گروه‌های شاهد روند کاهشی دارد و از رتبه کمتری برخوردار است و این کاهش با گروه‌های شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود، اما این اختلاف در کاهش میانگین  $IL_4$  گروه‌های ایمن معنی‌دار نیست ( $P < 0.05$ ). با این حال اثر توأم پلاسمید کد کننده ژن  $pcTSA$  با سیتوکین  $IL_{22}$  در تولید  $IL_4$  و اثر آن روی ماکروفاژها نیاز به بررسی بیشتری دارد؛ چرا که با وجود این که  $IL_{22}$  یک سیتوکین عضو خانواده  $IL_{10}$  است و  $IL_{10}$  به عنوان سرده‌ای این خانواده سیتوکین، یک مهار کننده مؤثر ایمنی

## References

1. Launois P, Tacchini-Cottier F, Kieny MP. Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7(8): 1277-87.
2. den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(10): 1471-7.
3. Rohrig E, Hamel D, Pfister K. Retrospective evaluation of laboratory data on canine vector-borne infections from the years 2004-2008. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2011; 124(9-10): 411-8.
4. Dumonteil E, McMahon-Pratt D, Price VL. Report of the fourth tdr/idri meeting on second-generation vaccines against leishmaniasis. Geneva, Switzerland: World Health Organization p. 53-58; 2001.
5. Mutiso JM, Macharia JC, Gicheru MM. A review of adjuvants for Leishmania vaccine candidates. *J Biomed Res* 2010; 24(1): 16-25.
6. Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTII leishmanial fusion proteins confers protection against Leishmania major infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun* 2002; 70(6): 2828-36.
7. Coelho EA, Tavares CA, Lima KM, Silva CL, Rodrigues JM, Fernandes AP. Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against Leishmania (Leishmania) major infection. *Parasitol Res* 2006; 98(6): 568-75.
8. Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of Leishmania major that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol* 1996; 157(11): 5034-41.
9. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 1998; 66(7): 3279-89.
10. Campos-Neto A, Porrozzio R, Greeson K, Coler

- RN, Webb JR, Seiky YA, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun* 2001; 69(6): 4103-8.
11. Mauel J. Vaccination against Leishmania infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; 2(3): 201-26.
  12. Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, Evans-Davis K. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1999; 163(8): 4481-8.
  13. Mendez S, Belkaid Y, Seder RA, Sacks D. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2002; 20(31-32): 3702-8.
  14. Kwissa M, Lindblad EB, Schirmbeck R, Reimann J. Codelivery of a DNA vaccine and a protein vaccine with aluminum phosphate stimulates a potent and multivalent immune response. *J Mol Med (Berl)* 2003; 81(8): 502-10.
  15. Carvalho JA, Azzoni AR, Prazeres DM, Monteiro GA. Comparative analysis of antigen-targeting sequences used in DNA vaccines. *Mol Biotechnol* 2010; 44(3): 204-12.
  16. Ahmed SB, Touihri L, Chtourou Y, Dellagi K, Bahloul C. DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant Leishmania (Leishmania) major antigens confers full protection in BALB/c mice. *Vaccine* 2009; 27(1): 99-106.
  17. Ahmed SB, Bahloul C, Robbana C, Askri S, Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to L. major. *Vaccine* 2004; 22(13-14): 1631-9.
  18. Aujla SJ, Kolls JK. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87(5): 451-4.
  19. Conti P, Kempuraj D, Frydas S, Kandere K, Boucher W, Letourneau R, et al. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunol Lett* 2003; 88(3): 171-4.
  20. Igawa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol Immunol* 2006; 43(7): 999-1009.
  21. Dumoutier L, Van RE, Ameye G, Michaux L, Renaud JC. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes. *Genes Immun* 2000; 1(8): 488-94.
  22. Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani. *J Clin Invest* 2009; 119(8): 2379-87.
  23. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 174(6): 3695-702.
  24. Dhiman R, Indramohan M, Barnes PF, Nayak RC, Paidipally P, Rao LV, et al. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion. *J Immunol* 2009; 183(10): 6639-45.
  25. Tabatabaie F, Ghaffari far F, Dalimi A, Sharifi Z, Hoseini A. Cloning and sequencing of Leishmania major Thiol-Specific-Antioxidant Antigen (TSA) Gene. *Iranian J Parasitol* 2007; 2(4): 30-41.
  26. Fatemeh G, Fatemeh T, Zohreh S, Abdolhosein D, Mohammad ZH, Mehdi M. Cloning of a Recombinant Plasmid Encoding Thiol-Specific Antioxidant Antigen (TSA) Gene of Leishmania major and Expression in the Chinese Hamster Ovary Cell Line. *Malays J Med Sci* 2012; 19(1): 15-9.
  27. Sasaki S, Takeshita F, Xin KQ, Ishii N, Okuda K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 2003; 31(3): 243-54.
  28. Fernandez-Botran R, Vetvicka V. *Methods in Cellular Immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, NY: CRC Press; 2001.
  29. Verma A, Prasad KN, Singh AK, Nyati KK, Gupta RK, Paliwal VK. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis. *J Microbiol Methods* 2010; 81(2): 175-8.
  30. Ziaee Hezarjaribi H, Ghafari far F, Dalimi Asl, Sharifi Z. The survey of the effect of cytokine IL22 on the ulcer originated from L- Major in BALB/c mice. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2011; 21(86): 282-92. (Persian).
  31. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol* 2007; 150(3): 407-15.
  32. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119(12): 3573-85.
  33. Hezarjaribi HZ, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sharifi Z, Jorjani O. Effect of IL-22 on DNA vaccine encoding LACK gene of Leishmania major in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 2013; 134(3): 341-8.
  34. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998; 160(11): 5347-54.
  35. Rodriguez F, Whitton JL. Enhancing DNA immunization. *Virology* 2000; 268(2): 233-8.